

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 15/62, 15/63, C12P 21/02	A1	(11) 国際公開番号 WO97/03190 (43) 国際公開日 1997年1月30日 (30.01.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01899 (22) 国際出願日 1996年7月9日 (09.07.96) (30) 優先権データ 特願平7/174778 1995年7月11日 (11.07.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 相模中央化学研究所 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER)[JP/J] 〒229 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号 Kanagawa, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 加藤誠志(KATO, Seishi)[JP/J] 〒228 神奈川県相模原市南台1-9-2 Kanagawa, (JP) 山口知子(YAMAGUCHI, Tomoko)[JP/J] 〒125 東京都葛飾区高砂5-13-11 Tokyo, (JP) 関根伸吾(SEKINE, Shingo)[JP/J] 〒229 神奈川県相模原市西大沼4-4-1 Kanagawa, (JP) 鎌田貢壽(KAMATA, Kouju)[JP/J] 〒228 神奈川県相模原市上鶴間5-17-8 Kanagawa, (JP)		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: HUMAN GALECTIN-4-LIKE PROTEIN AND cDNA ENCODING THE SAME (54)発明の名称 ヒトガレクチン-4様蛋白質およびそれをコードするcDNA (57) Abstract A galectin-4 (a lactose-binding protein)-like protein expressed specifically in the stomach and intestines and a human cDNA encoding the same. The protein is one containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 while the gene is a cDNA containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 2. The protein which is the expression product of this cDNA has a lactose-binding activity and is applicable to drugs and research reagents.		

(57) 要約

本発明は、胃腸に特異的に発現しているラクトース結合蛋白質ガレクチン-4様蛋白質およびそれをコードするヒトcDNAを提供する。本発明の蛋白質および遺伝子は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質および配列番号2で表される塩基配列を含むcDNAであり、このヒトcDNAの発現産物である蛋白質はラクトース結合活性を示し、医薬や研究用試薬として利用できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイスランド		ヴァイア共和国	TH	タイ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モリタニア	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	US	アメリカ合衆国
CN	中国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CU	キューバ	KZ	大韓民国	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国		カザフスタン	NZ	ニュージーランド		

明 細 書

ヒトガレクチン-4 様蛋白質およびそれをコードするcDNA

5

技術分野

本発明は、ヒト細胞内で発現しているmRNAに由来する新規cDNA、およびそれがコードするガレクチン-4 様蛋白質に関する。本発明のヒトcDNAは、遺伝子診断用プローブや遺伝子治療用遺伝子源として用いることが出来る。また、該cDNAがコードしている蛋白質を大量生産するための遺伝子源として用いることが出来る。本発明の蛋白質は、医薬や糖鎖研究のための試薬として用いることが出来る。

10

背景技術

ガレクチンはガラクトースと結合する動物レクチンの総称である。動物レクチンは細胞質、核、細胞膜表面など様々な部位に存在し、細胞増殖、分化、癌化、転移、免疫などに関与していると考えられている[Drickamer, K., Annu. Rev. Cell Biol., 9:237-264(1993)]。この中で、ガレクチン-4はラットの腸の抽出物中に多量に含まれているレクチンとして見いだされた。ガレクチン-4は、胃や腸などの消化管に特異的に発現し、粘膜に多量に存在していることから、これらの器官の機能維持に不可欠な蛋白質であると考えられている。これまでにラットからガレクチン-4をコードするcDNAがクローン化されているが[Oda, Y. et al., J. Biol. Chem., 268:5929-5939(1993)]、ヒトガレクチン-4 様蛋白質をコードするcDNAについての報告はない。

15

20

25 発明の開示

本発明者らは鋭意研究の結果、ガレクチン-4 様蛋白質をコードするヒトcDNAをクローン化し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、ガレクチン-4 様蛋白質である、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質を提供する。また本発明は上記アミノ酸配列をコードするcDNA及び、その具体例としての配列番号2又は3で表される塩基配列を含むcDNAを提供する。

30

本発明のヒトcDNAは、ヒト細胞由来cDNAライブラリーからクローン化することが出来る。このcDNAライブラリーはヒト細胞から抽出した ポリ(A)⁺RNAを鋳型として作製する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。実施例では胃癌組織から単離したポリ(A)⁺RNAを用いた。c

5 DNAの合成にあたっては、岡山-Berg法[Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2:161-170(1982)], Gubler-Hoffman法[Gubler, U. and Hoffman, J. Gene, 25:263-269(1983)]などいかなる方法を用いてもよいが、完全長クローンを効率的に 得るためには、実施例にあげたようなキャッピング法[Kato, S. et al., Gene, 150:243-250(1994)]を用いることが望ましい。cDNAの同定は、シーケンシングによる全塩基配列の決定、塩基配列から予測されるアミノ酸配列と類似配列を有する既知蛋白質の検索、インビトロ翻訳による蛋白質発現、大腸菌による発現、発現産物の活性測定によって行なう。活性測定は、ラクトースとの結合能を確認することによって行なう。

10

本発明のcDNAは、配列番号1で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、

15 例えば配列番号2で表される塩基配列を含むことを特徴とするものである。例えば、配列番号3で表されるものは、1113bpからなる塩基配列を有し、972bpのオープンリーディングフレームを有している。このオープンリーディングフレームは、323アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしている。この蛋白質はアミノ酸配列レベルでラットガレクチン-4と76.3%という高い類似性を有している。

20 なお、配列番号3に記載の、cDNAの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、胃腸組織あるいは胃腸由来細胞株から作製したヒトcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のcDNAと同一のクローンを容易に得ることが出来る。

一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号1

25 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列あるいは配列番号3において、1又は複数個のヌクレオチドの付加、欠失および/又は他のヌクレオチドによる置換がなされているcDNAも本発明の範疇にはいる。

同様に、これらの変更によって生じる、1又は複数個のアミノ酸の付加、欠失および/又は他のアミノ酸による置換がなされている蛋白質も、本発明の範疇に入る。

30

本発明のcDNAには、配列番号2あるいは3で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含むcDNA断片(10bp以上)も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなるDNA断片もこの範疇にはいる。これらのDNA断片は遺伝子診断用のプローブとして用いることができる。

- 5 本発明の蛋白質は、本発明のcDNAを有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現出来る。また翻訳領域を公知の方法を用いて適当な発現ベクターに組換えることにより、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、コードしている蛋白質を大量に発現させることもできる。あるいは下記配列表に示すアミノ酸配列に基づき、化学合成によってペプチドを調製することも出来る。
- 10

本発明の蛋白質の範囲には、ラクトース結合活性を有するものであれば、他の任意の蛋白質との融合蛋白質も含まれる。例えば、実施例に挙げたマルトース結合蛋白質との融合蛋白質が例示できる。

15 図面の簡単な説明

図1は本発明のプラスミドpHP01049の構造を示す。

図2は本発明の大腸菌用発現ベクターpMKGAL4の構造を示す。

発明を実施するための最良の形態

- 20 次に実施例により発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。DNAの組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献["Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989]に従った。制限酵素および各種修飾酵素は、特に記載の無い場合、宝酒造社製のものをを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書
- 25 に従った。cDNA合成は文献[Kato, S. et al., Gene, 150:243-250(1994)]に従った。

実施例

ポリ(A)⁺RNAの調製

ヒト胃癌組織1gを5.5Mグアニジウムチオシアネート溶液20ml中でホモジナイズ
5 した後、文献[Okayama、H. et al., "Methods in Enzymology" Vol. 164, Academic
Press, 1987]に従い、750 μ gのmRNAを調製した。これを20mM トリス塩酸緩衝液(pH
7.6)、0.5M NaCl、1mM EDTAで洗浄したオリゴdTセルロースカラムにかけ、上掲
文献に従いポリ(A)⁺RNA 10 μ gを得た。

10 cDNAライブラリーの作製

上記ポリ(A)⁺RNA 10 μ gを100mM トリス塩酸緩衝液(pH 8)に溶解し、RNaseを含
まないバクテリア由来アルカリホスファターゼ 1単位を添加し、37°C1時間反応
させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを50mM
酢酸ナトリウム(pH 6)、1mM EDTA、0.1% 2-メルカプトエタノール、0.01% Triton
15 X-100溶液に溶解した。これに、タバコ由来酸ピロホスファターゼ(エピセンター
テクノロジーズ社製)1単位を添加して、総量100 μ lで37°C1時間反応させた。反
応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを水に溶解し、脱
キャップ処理したポリ(A)⁺RNA溶液を得た。

脱キャップ処理したポリ(A)⁺RNA、DNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド
20 (5'-dG-dG-dG-dG-dA-dA-dT-dT-dC-dG-dA-G-G-A-3') 3nmolを50mM トリス塩酸緩衝
液(pH 7.5)、0.5mM ATP、5mM MgCl₂、10mM 2-メルカプトエタノール、25%ポリエ
チレングリコール水溶液に溶解し、T4RNAリガーゼ 50単位を添加し、総量30 μ l
で20°C12時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、
ペレットを水に溶解し、キメラオリゴキャップ付加ポリ(A)⁺RNAを得た。

25 本発明者らが開発したベクターpKA1(EP 426455-A)をKpnIで消化後、末端転移
酵素により約60個のdTテールを付加した。これをEcoRV消化して片側のdTテール
を除去したものをベクタープライマーとして用いた。

先に調製したキメラオリゴキャップ付加ポリ(A)⁺RNA 6 μ gを、ベクタープライ
マー 1.2 μ gとアニールさせた後、50mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.3)、75mM KCl、
30 3mM MgCl₂、10mM ジチオスレイトール、1.25mM dNTP(dATP+dCTP+dGTP+dTTP)溶液

に溶解し、逆転写酵素(GIBCO-BRL社製)200単位を添加し、総量20 μ lで42°C1時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、100mM NaCl、10mM MgCl₂、1mM ジチオスレイトール溶液に溶解した。これにEcoRI 100単位を添加し、総量20 μ lで37°C1時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、100mM KCl、4mM MgCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、50 μ g/ml 牛血清アルブミン溶液に溶解した。これに大腸菌DNAリガーゼ 60単位を添加し、16°C16時間反応させた。反応液に2mM dNTP 2 μ l、大腸菌DNAポリメラーゼI 4単位、大腸菌RNaseH 0.1単位を添加し、12°C1時間ついで22°C1時間反応させた。

10 次いでcDNA合成反応液を用いて大腸菌DH12S(GIBCO-BRL社製)の形質転換を行なった。形質転換はエレクトロポレーション法によって行なった。形質転換体の一部を100 μ g/mlアンピシリン含有2xYT寒天培地上に蒔いて37°C一晚培養した。寒天上に生じた任意のコロニーを拾い、100 μ g/mlアンピシリン含有2xYT培地2mlに接種して37°C2時間培養後、ヘルパーファージMK13KO7(ファルマシア社)を感染させ、さらに37°C一晚培養した。培養液を遠心して、菌体と上清に分け、菌体からはアルカリリシス法により2本鎖プラスミドDNAを、上清からは常法に従い一本鎖ファージDNAを単離した。2本鎖プラスミドDNAはEcoRIとNotIで二重消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動を行ないcDNAインサートの大きさを求めた。一方一本鎖ファージDNAは、蛍光色素で標識したM13ユニバーサルプライマーとTaqポリメラーゼ(アプライドバイオシステムズ社製キット)を用いてシーケンス反応を行なった後、蛍光DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社)にかけてcDNAの5'末端約400bpの塩基配列を決定した。配列データはホモ・プロテインcDNAバンクデータベースとしてファイル化した。

25 cDNAクローニング

上記cDNAライブラリーから任意に選択したクローンの塩基配列決定を行ない、得られた塩基配列を3フレームのアミノ酸配列に変換した後、これらの配列でプロテインデータベースを検索した。解析ソフトウェアはGENETYX-MAC(ソフトウェア開発社製)を用いた。その結果、クローンHP01049がコードしている蛋白質は、ラットガレクチン-4とアミノ酸配列レベルで類似性を有していることが判明した。

このクローンの構造を図1に示す。cDNAインサートの全塩基配列を決定したところ、56bpの5' 非翻訳領域、972bpのオープンリーディングフレーム、85bpの3' 非翻訳領域、37bpのポリ(A)テールからなる構造を有していた(配列番号3)。オープンリーディングフレームは323アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、この配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、全領域にわたってラットガレクチン-4のアミノ酸配列と76.3%という高い類似性を有していた。表1に、本発明のヒトガレクチン-4様蛋白質(HS)とラットガレクチン-4(RN)のアミノ酸配列の比較を示す。-(マクス)はギャップを、*(アスタリスク)は本発明の蛋白質と同一アミノ酸残基を、.(ドット)は本発明の蛋白質と類似アミノ酸残基をそれぞれ表す。

表1

	HS	MAYVPAPGYQPTYNPTLPYYQPIPGGLNVGMSVYIQGVASEHMKRFFVNFVVGQDPCSDV
		*****.*****.****.****.*...*.** ***.****.*.*
	RN	MAYVPAPGYQPTYNPTLPYKRPIPGGLSVGMSIYIQGIAKDNMRRFHVNFVAVGQDEGADI
15	HS	AFHFNPRFDGWDKVVFNLTQGGKWGSEERKRSMPFKKGAFAELVFIVLAEHYKVVVNGNP
		*****.*****.****.****.*...*.** ***.****.*.*
	RN	AFHFNPRFDGWDKVVFNLTQSGQWGKEKKKSMFPQKGGHFFELVFMVMSEHYKVVVNGTP
	HS	FYEYGHRLPLQMVTHLQVDGLQLQSINFIGGQPLRPQ--GPPMPPYPGPGHCHQQLNS
		*****.*****.****.*...*.** ***.****.*.*
20	RN	FYEYGHRLPLQMVTHLQVDGDLQLQSINFLGGQPAASQYPGTMTIPAYPSAGYNPPQMNS
	HS	LPTMEGPPTFNPPVPYFGRLQGGLTARRTIIKGYVPPTGKSFAINFKVGSSGDIALHIN
		..*****.******.****.****.*...*.** ***.****.*.*
	RN	LPVMAGPPIFNPPVPYVGTLLQGGLTARRTIIKGYVLPATKNIINFKVGSTGDI AFHFN
	HS	PRMGNGTVVRNSLLNGSWGSEKKITHNPFPGQFFDLSIRCGLDRFKVFYANGQHLFDFA
25		***.***.*****.*****.****.****.*****.*****.*****.*****.
	RN	PRIGD-CVVRNSYMNGSWGSEERKIPYNPFAGQFFDLSIRCGTDRFKVFANGQHLFDFA
	HS	HRLSAFQRVDTLTIQGDVTLSTVYQI
		.**.****.****.*****
	RN	HRFQAFQRVDMLEIKGDITLSVYQI

なお得られたcDNAの配列を用いて塩基配列データベースGenBank™/EMBL/DBJを検索した結果、ESTデータベースの中に配列番号3で表される本発明のcDNAの3'非翻訳領域(1022番目から1113番目)と部分的に一致するcDNAの部分配列(Accession No. D25577)が登録されていることがわかった。ただし、部分配列が一致するからといって、この断片と本発明の完全長cDNAが同じmRNAに由来するという保証はない。またこの配列からだけでは、コードしているかもしれない蛋白質のアミノ酸配列並びに機能はわからない。

インビトロ翻訳による蛋白質合成

10 本発明のcDNAを有するベクターpHP01049を用いて、T₇Tウサギ 網状赤血球溶解物キット(プロメガ社製)によるインビトロ翻訳を行なった。この際[³⁵S]メチオニンを添加し、発現産物をラジオアイソトープでラベルした。いずれの反応もキットに付属のプロトコールに従って行なった。プラスミドpHP01049 2μgを、T₇Tウサギ網状赤血球溶解物50 μl、緩衝液(キットに付属)4 μl、アミノ酸混合液(メチオニンを含まない)2 μl、[³⁵S]メチオニン(アマーシャム社)8 μl(0.37MBq/μl)、T7RNAポリメラーゼ2 μl、RNasin 80Uを含む総量100 μlの反応液中で30℃で90分間反応させた。反応液3 μlにSDSサンプリングバッファー(125mM トリス塩酸緩衝液、pH6.8、120mM 2-メルカプトエタノール、2% SDS溶液、0.025% ブロモフェノールブルー、20% グリセロール)2 μlを加え、95℃3分間加熱処理した後、SDS-

20 ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。オートラジオグラフィーを行ない、翻訳産物の分子量を求めた結果、本発明のcDNAは、分子量約36kDaの翻訳産物を生成した。この値は、配列番号3で表される塩基配列から予想される蛋白質の予想分子量35940と一致し、このcDNAが確かに配列番号3で表される蛋白質をコードしていることが示された。

インビトロ翻訳産物のラクトース結合活性測定

セファロース4Bゲル懸濁液(ファルマシア社)100mlを0.5M炭酸ナトリウムで十分洗浄した後、100mlの0.5M炭酸ナトリウムに懸濁した。これにビニルスルホン10mlを添加し、室温で1時間緩やかに攪拌した。ゲルを0.5M炭酸ナトリウムで洗浄した後、10%ラクトース、0.5M炭酸ナトリウム溶液に懸濁し室温で一晩緩やか

に攪拌した。ゲルを0.5M炭酸ナトリウム、水、0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で順次洗浄した。得られたラクトース固定化セファロース4Bゲルは、0.02%アジ化ナトリウムを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.0)中、4℃で保存した。

- 5 インビトロ翻訳反応液100 μ lをセファデックスG-75にかけて、未反応の[35 S]メチオニンを除去し、36kDaの翻訳産物を含む画分を集めた。この溶液を先に調製したラクトース固定化セファロース4Bカラム(ベッド容積4.5ml)にかけ、ラクトースカラム用カラム緩衝液(20mM トリス塩酸緩衝液、pH 7.5、2mM EDTA、150mM NaCl、4mM 2-メルカプトエタノール、0.01% Triton X-100)20mlで洗浄後、0.3M ラクトースを含むカラム緩衝液20mlで溶出した。その結果、溶出画分に36kDaの翻訳産物が含まれていることから、本発明の蛋白質はラクトース結合能を有することが示された。
- 10

大腸菌による融合蛋白質の発現

- 15 プラスミドpHP01049 1 μ gを、20単位のNotIで消化した後、クレノウ処理により平滑末端化を行なった。ついでPstIで消化した後、1% アガロースゲル電気泳動にかけ、1.2kbpのDNA断片をゲルから切り出した。

- 次いでpMALTM-c2(ニューイングランドバイオラボス社)1 μ gを、20単位のHindIIIで消化した後、クレノウ処理により平滑末端化を行なった。ついでPstIで消化した後、1%アガロースゲル電気泳動にかけ、6.7kbpのDNA断片をゲルから切り出した。
- 20 た。ベクター断片とcDNA断片をライゲーションキットにより連結後、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpMALGAL4を調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。

- pMALGAL4/JM109の一晩培養液10mlを100 μ g/mlアンピシリン含有リッチ培地(1リットル当たりトリプトン 10g、酵母抽出物 5g、NaCl 5g、グルコース 2gを含む)500mlに懸濁し、37℃で振盪培養し、 A_{600} が約0.5になったときにイソプロピルチオガラクトシドを1mMになるように添加した。さらに37℃で3時間培養後、遠心によって集菌し、菌体をアミロースカラム用カラム緩衝液(10mM トリス塩酸、pH 7.4、200mM NaCl、1mM EDTA)25mlに懸濁した。この溶液を超音波処理後、遠心し、上澄をベッド容積3.5mlのアミロースカラム(ニューイングランドバイオ
- 25
- 30 ラボス社)にかけた。カラム体積の8倍量のカラムバッファーでカラムを洗浄後、

10mMマルトースを含むカラム緩衝液20mlでマルトース結合蛋白質/ガレクチン-4様蛋白質融合蛋白質を溶出し、10.9mgの融合蛋白質を得た。融合蛋白質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、約81kDaの位置に単一のバンドが認められた。この分子量の値は、マルトース結合蛋白質/ガレクチン-4融合蛋白質の予想分子量と一致する。

融合蛋白質のラクトース結合活性測定

上記で調製した融合蛋白質を、先に調製したラクトース固定化セファロース4Bカラム(ベッド容積4.5ml)にかけ、ラクトースカラム用カラム緩衝液20mlで洗浄後、0.3Mラクトースを含むカラム緩衝液20mlで溶出した。溶出してきた蛋白質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、81kDaの位置に単一のバンドが認められたことから、大腸菌で発現させて得られたマルトース結合蛋白質/ガレクチン-4融合蛋白質は、ラクトース結合活性を有することが示された。

15 大腸菌によるガレクチン-4様蛋白質の発現

プラスミドpHP01049 1 μ gを、20単位のNotIで消化した後、クレノウ処理により平滑末端化を行なった。ついでAatIIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約1kbpのDNA断片をゲルから切り出した。ついで、tacプロモーター、メタピロカテカーゼのSD配列、rrnBT12ターミネーターを有する大腸菌用発現ベクターpMPRA3(Japan Kokai Tokyo koho, Jp 02,182186)1 μ gを20単位のAatIIとSmaIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約2.8kbpのDNA断片をゲルから切り出した。両者のDNA断片をライゲーションキットにより連結後、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpMKGAL4-AatIIを調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。

25

2本のオリゴヌクレオチドプライマーPR1(5'-GGGACGTCATGGCCTATGTCCCCGACC-3')とPR2(5'-GGCGACGCTCTGAGCCCGGATCCTGCCC-3')をDNA自動合成機(アプライドバイオシステムズ社)により付属のプロトコールに従い合成した。プラスミドpHP01049をIngとプライマーPR1、PR2それぞれ100pmoleを用いて、PCRキット(宝酒造社)によりcDNAの5'側翻訳領域を増幅した。フェノール抽出、エタノール沈殿後、20単

30

位のAatII(東洋紡)で消化し、反応産物を1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、約190bpのDNA断片をゲルから切り出し精製した。

- 5 プラスミドpMKGAL4-AatII 1 μ gを、20単位のAatIIで消化した後、1%アガロースゲル電気泳動にかけ、3.8kbpのDNA断片をゲルから切り出した。このDNA断片と先にPCRによって調製した約190bpのDNA断片を、ライゲーションキットにより連結後、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpMKGAL4を調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。得られたプラスミドの構造を図2に示す。
- 10 pMKGAL4/JM109の一晩培養液 10mlを100 μ g/mlアンピシリン含有LB培地100mlに懸濁し、37 $^{\circ}$ Cで振盪培養し、A₆₀₀が約0.5になったときにイソプロピルチオガラクトシドを1mMになるように添加した。さらに37 $^{\circ}$ Cで3時間培養後、遠心によって集菌し、菌体をラクトースカラム用カラム緩衝液25mlに懸濁した。この溶液を超音波処理後、遠心し、上澄を先に調製したラクトース固定化セファロース4Bカラム(ベッド容積4.5ml)にかけ、ラクトースカラム用カラム緩衝液20mlで洗浄後、
- 15 0.3Mラクトースを含むカラム緩衝液20mlで溶出した。溶出してきた蛋白質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、36kDaの位置に単一のバンドが認められた。この分子量の値は、ヒトガレクチン-4様蛋白質の予想分子量と一致する。すなわち、大腸菌で発現させたヒトガレクチン-4様蛋白質はラクトース結合
- 20 活性を有することが示された。

産業上の利用可能性

- 本発明はガレクチン-4様蛋白質をコードするヒトcDNA、このヒトcDNAがコードする蛋白質を提供する。本発明のcDNAを用いることにより、該組換え蛋白質を大
- 25 量に発現することができる。該組換え蛋白質は、医薬、特に消化管医薬として、あるいは研究用試薬、特に糖鎖研究用試薬として利用することができる。

配列番号 : 1

配列の長さ : 323

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

5 配列

Met Ala Tyr Val Pro Ala Pro Gly Tyr Gln Pro Thr Tyr Asn Pro Thr
1 5 10 15
Leu Pro Tyr Tyr Gln Pro Ile Pro Gly Gly Leu Asn Val Gly Met Ser
20 25 30
10 Val Tyr Ile Gln Gly Val Ala Ser Glu His Met Lys Arg Phe Phe Val
35 40 45
Asn Phe Val Val Gly Gln Asp Pro Gly Ser Asp Val Ala Phe His Phe
50 55 60
Asn Pro Arg Phe Asp Gly Trp Asp Lys Val Val Phe Asn Thr Leu Gln
15 65 70 75 80
Gly Gly Lys Trp Gly Ser Glu Glu Arg Lys Arg Ser Met Pro Phe Lys
85 90 95
Lys Gly Ala Ala Phe Glu Leu Val Phe Ile Val Leu Ala Glu His Tyr
100 105 110
20 Lys Val Val Val Asn Gly Asn Pro Phe Tyr Glu Tyr Gly His Arg Leu
115 120 125
Pro Leu Gln Met Val Thr His Leu Gln Val Asp Gly Asp Leu Gln Leu
130 135 140
Gln Ser Ile Asn Phe Ile Gly Gly Gln Pro Leu Arg Pro Gln Gly Pro
25 145 150 155 160
Pro Met Met Pro Pro Tyr Pro Gly Pro Gly His Cys His Gln Gln Leu
165 170 175
Asn Ser Leu Pro Thr Met Glu Gly Pro Pro Thr Phe Asn Pro Pro Val
180 185 190
30 Pro Tyr Phe Gly Arg Leu Gln Gly Gly Leu Thr Ala Arg Arg Thr Ile

	195	200	205
	Ile Ile Lys Gly Tyr Val Pro Pro Thr Gly Lys Ser Phe Ala Ile Asn		
	210	215	220
	Phe Lys Val Gly Ser Ser Gly Asp Ile Ala Leu His Ile Asn Pro Arg		
5	225	230	235
	Met Gly Asn Gly Thr Val Val Arg Asn Ser Leu Leu Asn Gly Ser Trp		
	245	250	255
	Gly Ser Glu Glu Lys Lys Ile Thr His Asn Pro Phe Gly Pro Gly Gln		
	260	265	270
10	Phe Phe Asp Leu Ser Ile Arg Cys Gly Leu Asp Arg Phe Lys Val Tyr		
	275	280	285
	Ala Asn Gly Gln His Leu Phe Asp Phe Ala His Arg Leu Ser Ala Phe		
	290	295	300
	Gln Arg Val Asp Thr Leu Glu Ile Gln Gly Asp Val Thr Leu Ser Tyr		
15	305	310	315
	Val Gln Ile		320

配列番号: 2

配列の長さ: 969

20 配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源:

25 配列

ATGGCCTATG TCCCCGCACC GGGCTACCAG CCCACCTACA ACCCGACGCT GCCTTACTAC	60
CAGCCCATCC CGGGCGGGCT CAACGTGGGA ATGTCTGTTT ACATCCAAGG AGTGGCCAGC	120
GAGCACATGA AGCGGTTCCT CGTGAACCTT GTGGTTGGGC AGGATCCGGG CTCAGACGTC	180
GCCTTCCACT TCAATCCGCG GTTTGACGGC TGGGACAAGG TGGTCTTCAA CACGTTGCAG	240
30 GCGGGGAAGT GGGGCAGCGA GGAGAGGAAG AGGAGCATGC CCTTCAAAAA GGGTGCCGCC	300

TTTGAGCTGG TCTTCATAGT OCTGGCTGAG CACTACAAGG TGGTGGTAAA TGGAAATCCC 360
TTCTATGAGT ACGGGCACCG GCTTCCOCTA CAGATGGTCA CCCAOCCTGCA AGTGGATGGG 420
GATCTGCAAC TTCAATCAAT CAACTTCATC GGAGGCCAGC CCCTCCGGCC CCAGGGACCC 480
CCGATGATGC CACCTTACCC TGGTCCCGGA CATTGCCATC AACAGCTGAA CAGCCTGCCC 540
5 ACCATGGAAG GACCCCAAC CTTCAACCCG OCTGTGCCAT ATTTCCGGAG GCTGCAAGGA 600
GGGCTCACAG CTCGAAGAAC CATCATCATC AAGGGCTATG TGCCCTCCAC AGGCAAGAGC 660
TTTGCTATCA ACTTCAAGGT GGGCTCCTCA GGGGACATAG CTCTGCACAT TAATCCCCGC 720
ATGGGCAACG GTACCGTGGT CCGGAACAGC CTTCTGAATG GCTCGTGGG ATCCGAGGAG 780
AAGAAGATCA CCCACAACCC ATTTGGTCCC GGACAGTTCT TTGATCTGTC CATTGCTGT 840
10 GGCTTGGATC GCTTCAAGGT TTACGCCAAT GGCCAGCACC TCTTTGACTT TGCCCATCGC 900
CTCTCGGCCT TCCAGAGGGT GGACACATTG GAAATCCAGG GTGATGTCAC CTTGTCTAT 960
GTCCAGATC 969

配列番号 : 3

配列の長さ : 1113

15 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源 :

20 生物名 : ホモ=サピエンス

細胞の種類 : 胃癌組織

クローン名 : HP01049

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : CDS

25 存在位置 : 57..1029

特徴を決定した方法 : E

配列

ATCTCCCACT CCTGCAGCTC TTCTCACAGG ACCAGCCACT AGCGCAGCCT CGAGCG ATG 59

Met

30

1

	GCC TAT GTC CCC GCA CCG GGC TAC CAG CCC ACC TAC AAC CCG ACG CTG	107
	Ala Tyr Val Pro Ala Pro Gly Tyr Gln Pro Thr Tyr Asn Pro Thr Leu	
	5 10 15	
	OCT TAC TAC CAG CCC ATC CCG GGC GGG CTC AAC GTG GGA ATG TCT GTT	155
5	Pro Tyr Tyr Gln Pro Ile Pro Gly Gly Leu Asn Val Gly Met Ser Val	
	20 25 30	
	TAC ATC CAA GGA GTG GCC AGC GAG CAC ATG AAG CCG TTC TTC GTG AAC	203
	Tyr Ile Gln Gly Val Ala Ser Glu His Met Lys Arg Phe Phe Val Asn	
	35 40 45	
10	TTT GTG GTT GGG CAG GAT CCG GGC TCA GAC GTC GCC TTC CAC TTC AAT	251
	Phe Val Val Gly Gln Asp Pro Gly Ser Asp Val Ala Phe His Phe Asn	
	50 55 60 65	
	CCG CGG TTT GAC GGC TGG GAC AAG GTG GTC TTC AAC ACG TTG CAG GGC	299
	Pro Arg Phe Asp Gly Trp Asp Lys Val Val Phe Asn Thr Leu Gln Gly	
15	70 75 80	
	GGG AAG TGG GGC AGC GAG GAG AGG AAG AGG AGC ATG CCC TTC AAA AAG	347
	Gly Lys Trp Gly Ser Glu Glu Arg Lys Arg Ser Met Pro Phe Lys Lys	
	85 90 95	
	GGT GCC GCC TTT GAG CTG GTC TTC ATA GTC CTG GCT GAG CAC TAC AAG	395
20	Gly Ala Ala Phe Glu Leu Val Phe Ile Val Leu Ala Glu His Tyr Lys	
	100 105 110	
	GTG GTG GTA AAT GGA AAT CCC TTC TAT GAG TAC GGG CAC CGG CTT CCC	443
	Val Val Val Asn Gly Asn Pro Phe Tyr Glu Tyr Gly His Arg Leu Pro	
	115 120 125	
25	CTA CAG ATG GTC ACC CAC CTG CAA GTG GAT GGG GAT CTG CAA CTT CAA	491
	Leu Gln Met Val Thr His Leu Gln Val Asp Gly Asp Leu Gln Leu Gln	
	130 135 140 145	
	TCA ATC AAC TTC ATC GGA GGC CAG CCC CTC CGG CCC CAG GGA CCC CCG	539
	Ser Ile Asn Phe Ile Gly Gly Gln Pro Leu Arg Pro Gln Gly Pro Pro	
30	150 155 160	

	ATG ATG CCA CCT TAC CCT GGT CCC GGA CAT TGC CAT CAA CAG CTG AAC	587
	Met Met Pro Pro Tyr Pro Gly Pro Gly His Cys His Gln Gln Leu Asn	
	165 170 175	
	AGC CTG CCC ACC ATG GAA GGA CCC CCA ACC TTC AAC CCG CCT GTG CCA	635
5	Ser Leu Pro Thr Met Glu Gly Pro Pro Thr Phe Asn Pro Pro Val Pro	
	180 185 190	
	TAT TTC GGG AGG CTG CAA GGA GGG CTC ACA GCT CGA AGA ACC ATC ATC	683
	Tyr Phe Gly Arg Leu Gln Gly Gly Leu Thr Ala Arg Arg Thr Ile Ile	
	195 200 205	
10	ATC AAG GGC TAT GTG CCT CCC ACA GGC AAG AGC TTT GCT ATC AAC TTC	731
	Ile Lys Gly Tyr Val Pro Pro Thr Gly Lys Ser Phe Ala Ile Asn Phe	
	210 215 220 225	
	AAG GTG GGC TCC TCA GGG GAC ATA GCT CTG CAC ATT AAT CCC CGC ATG	779
	Lys Val Gly Ser Ser Gly Asp Ile Ala Leu His Ile Asn Pro Arg Met	
15	230 235 240	
	GGC AAC GGT ACC GTG GTC CGG AAC AGC CTT CTG AAT GGC TCG TGG GGA	827
	Gly Asn Gly Thr Val Val Arg Asn Ser Leu Leu Asn Gly Ser Trp Gly	
	245 250 255	
	TCC GAG GAG AAG AAG ATC ACC CAC AAC CCA TTT GGT CCC GGA CAG TTC	875
20	Ser Glu Glu Lys Lys Ile Thr His Asn Pro Phe Gly Pro Gly Gln Phe	
	260 265 270	
	TTT GAT CTG TCC ATT CGC TGT GGC TTG GAT CGC TTC AAG GTT TAC GCC	923
	Phe Asp Leu Ser Ile Arg Cys Gly Leu Asp Arg Phe Lys Val Tyr Ala	
	275 280 285	
25	AAT GGC CAG CAC CTC TTT GAC TTT GCC CAT CGC CTC TCG GCC TTC CAG	971
	Asn Gly Gln His Leu Phe Asp Phe Ala His Arg Leu Ser Ala Phe Gln	
	290 295 300 305	
	AGG GTG GAC ACA TTG GAA ATC CAG GGT GAT GTC ACC TTG TCC TAT GTC	1019
	Arg Val Asp Thr Leu Glu Ile Gln Gly Asp Val Thr Leu Ser Tyr Val	
30	310 315 320	

WO 97/03190

PCT/JP96/01899

CAG ATC TAATCTATTC CTGGGGOCAT AACTCATGGG AAAACAGAAT TATCC

1070

Gln Ile

CCTAGGACTC CTTTCTAAGC CCCTAATAAA ATGTCTGAGG GTG

1113

5

10

15

20

25

30

請 求 の 範 囲

1. 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。
2. 配列番号1で表されるアミノ酸配列をコードするcDNA。
- 5 3. 配列番号2で表される塩基配列を含む、請求項2記載のcDNA。
4. 配列番号3で表される塩基配列からなる、請求項3記載のcDNA。

10

15

20

25

30

Fig. 1

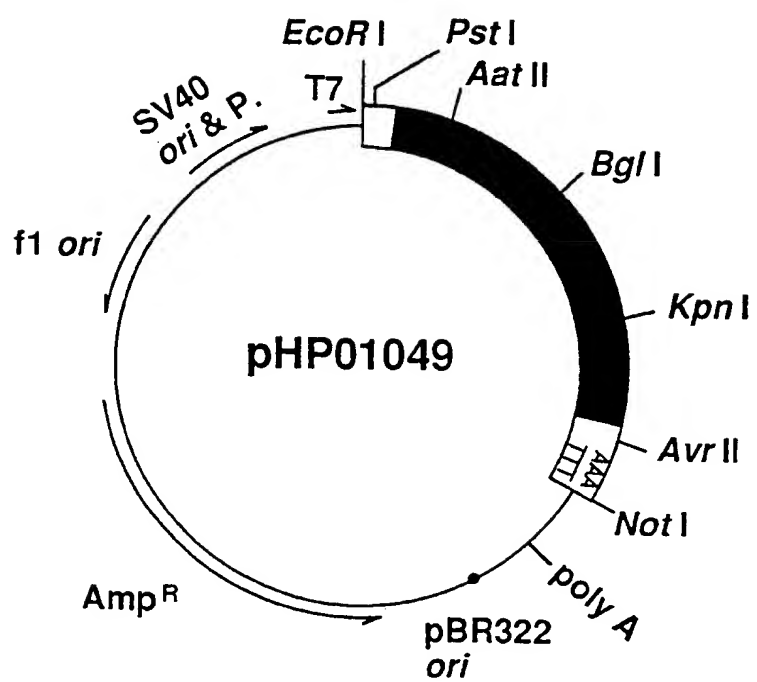
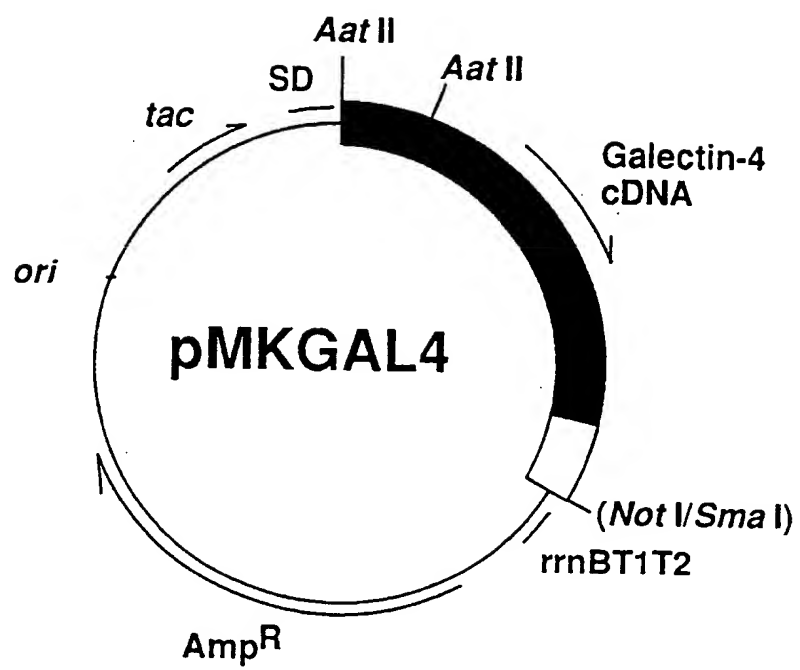


Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yuko Oda et al. "Soluble Lactose-binding Lectin from Rat Intestine with Two Different Carbohydrate-binding Domains in the Same Peptide Chain" J. Biol. Chem. (1993) Vol. 268, No. 8, p. 5929-5939	1 - 4
Y	Huflejt M. E. et al. "Galectin-4 expression in human adenocarcinomas is correlated with a highly differentiated phenotype" Journal of Cellular Biochemistry Supplement (1995. Apr.), Vol. 57, No. 19B, p. 20	1 - 4
Y	Hu P. et al. "Isolation of human cDNA for galectin-4 the homolog of a pig lactose-binding adherens junction protein" Journal of Investigative Dermatology (1995. May) Vol. 104, No. 4, p. 644	1 - 4
Y	Tardy F. et al. "Purification and characterization of the N-terminal domain of galectin-4 from rat small intestine" FEBS	1 - 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
August 26, 1996 (26. 08. 96)Date of mailing of the international search report
September 10, 1996 (10. 09. 96)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile No.Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Letters (1995. Feb. 13) Vol. 359, p. 169-172</p> <p>Feizi T. et al. "Galectins: A family of animal beta-glactoside-binding lectins" Cell (1994), Vol. 76, No. 4, p. 597-598</p>	1 - 4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ON LINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Yuko Oda et al. "Soluble Lactose-binding Lectin from Rat Intestine with Two Different Carbohydrate-binding Domains in the Same Peptide Chain" J. Biol. Chem. (1993) 第268巻 第8号 p. 5929-5939	1-4
Y	Huflejt M. E. et al. "Galectin-4 expression in human adenocarcinomas is correlated with a highly differentiated phenotype" Journal of Cellular Biochemistry Supplement (1995. Apr.) 第57巻 第19B号 p. 20	1-4
Y	Hu P. et al. "Isolation of human cDNA for galectin-4 the homolog of a pig lactose-binding adherens junction protein" Journal of Investigative Dermatology (1995. May) 第104巻 第4号 p. 644	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.08.96

国際調査報告の発送日

10.09.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 B 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Tardy F. et al. "Purification and characterization of the N-terminal domain of galectin-4 from rat small intestine" FEBS Letters (1995. Feb. 13) 第359巻 p. 169-172	1-4
A	Feizi T. et al. "Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins" Cell (1994) 第76巻 第4号 p. 597-598	1-4